

THESIS

MUNICH

1966

BANK MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

ÜBER DIE QUANTITATIVE BEZIEHUNG VON
SPHINGOMYELIN ZU DEN GESAMT-
PHOSPHATIDEN DES SERUMS

Sorusch/Sabet-Peyman

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. W. Seitz

ÜBER DIE QUANTITATIVE BEZIEHUNG VON
SPHINGOMYELIN ZU DEN GESAMT-
PHOSPHATIDEN DES SERUMS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sorusch Sabet-Peyman
aus Yazd / Iran

München 1966

A. Schubert, München 5, Corneliusstr. 21 - Telefon 22 17 77

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent:	Prof. Dr. N. ZÖLLNER
Korreferent:	Prof. Dr. W. SEITZ
Dekan:	Prof. Dr. R. ZENKER

Tag der mündlichen Prüfung: 11. 1. 1966

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit
gewidmet.

Inhaltsübersicht

	Seite
I. Einführung und Problemstellung	5
II. Methodik	8
Lipoidextrakt	9
Lipoidphosphorbestimmung	10
Sphingomyelinbestimmung	11
Berechnung	13
III. Ergebnis	15
IV. Diskussion	16
V. Zusammenfassung	18
VI. Literatur	19
VII. Anhang	20
Tabellen	20
Abbildungen	22
VIII. Lebenslauf	25



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. Einführung und Problemstellung

Sphingomyelin, wegen seiner Phosphorsäure den Phosphatiden zugerechnet, wurde erstmals im Jahre 1884 von Thudichum aus dem Gehirn isoliert. Es unterscheidet sich wesentlich von den übrigen Phosphatiden durch den Gehalt von zwei Stickstoffatomen pro Phosphoratom und Gesamtmolekül. An der Stelle des drei-wertigen Alkohol Glyzerin steht das Sphingosin (chemische Bezeichnung: Erythro - 2 - amino - Δ^4 (trans) - octadecen - 1,3 diol) (1), an dessen primärer Alkoholgruppe die Cholinphosphorsäure hängt. Die eine Fettsäure, meist Lignocerin-, aber auch Nervon-, Palmitin- und Stearinsäure, ist amidartig an den Stickstoff des Sphingosins gebunden.

Sphingomyelin kommt mit anderen Phosphatiden und auch Cerebrosiden in verschiedenen Organen wie Gehirn, Lunge, Leber, Milz, aber auch im Blut vor. Die höchste Konzentration erreicht es im Gehirn und in der Lunge, wo es bis zu 20 % der Phosphatide ausmachen kann (2). Über den

Gehalt im Serum werden Werte von 16% (3), 10 % (4), und 17 % (5) der Phosphatide angegeben.

Vom Stoffwechsel des Sphingomyelins ist bekannt, dass der interzelluläre Anteil ungewöhnlich stabil ist und von exogenen Faktoren wie Ernährung nicht so leicht beeinflusst werden kann, Sphingomyeline im allgemeinen jedoch einen deutlich rascheren intravitalen Abbau als etwa Cerebroside zeigen (6). Die physiologische Bedeutung des Sphingomyelins ist noch zu wenig untersucht, als dass man darüber definitive Aussagen machen könnte. Die Beziehungen der einzelnen Lipoidfraktionen untereinander und deren Auswirkungen auf den Reststoffwechsel stehen noch zur Diskussion. Abgesehen von gewissen Schwankungen scheint das Verhältnis der einzelnen Lipoidfraktionen zueinander physiologisch ziemlich konstant zu sein. Wichtig erscheint die Relation Cholesterin/Lipoidphosphor, die von Peters und Man (7) bei einem mittleren Cholesterinwert von 204,6 mg% mit $21,6 \pm 2,5$

angegeben wird. Der Wert nimmt aber bei erhöhtem Cholesteringehalt noch zu. Dieser Cholesterin/Phosphatid-Quotient wurde schon von mehreren Autoren (7) auf seine Brauchbarkeit als diagnostisches Hilfsmittel untersucht. So fand man bei Nephrosen, essentieller Xanthomatose und Arteriosklerose Werte grösser als 1,0 und glaubte, diese Erhöhung diagnostisch verwerten zu können. Dieser Befund ist jedoch nicht so konstant, als dass man ihn als zuverlässigen Test verwenden könnte. Es gibt Arteriosklerotiker mit einem Cholesterin/Phosphatid-Quotienten des Serums deutlich kleiner als 1,0. An sich ist es naheliegend, bei der Ähnlichkeit der Zusammensetzung von Lipoiden im Blutplasma und in Atheromen bei arteriosklerotischen Gefässwandprozessen an eine direkte Ablagerung von Lipoiden aus dem Plasma zu denken (8). Dies setzt jedoch eine Abweichung in der Blutzusammensetzung voraus.

Sphingomyelin, das schon in seiner chemischen Struktur von den anderen Phosphatiden abweicht, ist mit gewisser

Berechtigung auch physiologisch eine Sonderstellung einzuräumen. Es ist also durchaus denkbar, dass, wenn schon nicht im Verhältnis Cholesterin/Phosphatid mit genügender Sicherheit, so vielleicht in der Relation Sphingomyelin/Restphosphatide in Abhängigkeit vom Cholesteringehalt eine Verschiebung eintritt. Dies ist die Problemstellung dieser Arbeit.

Die Auswahl der Fälle erfolgte ungeachtet der klinischen Diagnose aus dem Krankengut der Universitäts-Poliklinik München. Cholesterin wurde im Rahmen der Routineanalysen im Hauptlabor mit der Methode nach Zak (9) bestimmt, der Rest der Serumprobe wurde nach Aufbereitung auf Lipoid-P und Sphingomyelin-P analysiert.

II. Methodik

Als Ausgangsmaterial dient frisch entnommenes Cubitalvenenblut, das nach vollständiger Gerinnung abzentrifugiert wird. Vom überstehenden Serum stellt man nach der von Zöllner (5) modifizierten Methode von Sperry (10) einen

Lipoidextrakt: Reagentien: Methanol p.a.
 Chloroform p.a.
 Calciumchloridlösung 0,02 %
 in aqua dest.

1 ml Serum wird in einem 25 ml Messkolben zu 8,3 ml Methanol langsam zugetropft. Anschliessendes Umschütteln und Aufkochen nach Zugabe von 9 ml Chloroform soll eine vollständige Fällung der Proteine bewirken. Der abgekühlte Kolben wird dann bis zur Marke mit Chloroform aufgefüllt. Dieser Extrakt wird möglichst rasch filtriert und 20 ml davon zur weiteren Abtrennung von nichtlipoiden Substanzen mit 4 ml einer 0,02 %-igen CaCl_2 -Lösung 1 Minute lang in einem 25 ml Schüttelzylinder kräftig geschüttelt. Nach etwa 8 Stunden haben sich 2 Phasen ausgebildet, von denen die untere aus Chloroform besteht und die Lipoide enthält. Für die spätere Berechnung wird die Menge der unteren Phase notiert. Die obere Phase, die sich aus Methanol und Wasser zusammensetzt, wird abgesaugt und verworfen.

Lipoidphosphorbestimmung:

Zur Bestimmung des Lipoidphosphors wurde die Methode von G.R.J. Bartlett (11) angewandt, bei der die aus Phosphatidionen und Ammoniummolybdat gebildete Phosphormolybdänsäure zu Molybdänblau reduziert wird.

Reagentien: 10 n Schwefelsäure
 Wasserstoffperoxyd (30%)
 Ammoniummolybdat 2,5%, wässrige Lösung
 Reduktionsmittel (Gemisch aus Ammino -
 2 - naphthol - 4 - sulfosäure und Na-
 triumdisulfit)
 Aqua bidest.
 Standardlösung von 2 μ P/ml 0,002 n H_2SO_4
 Reinlich gesäuberte Glaswaren

Eine etwa 2 μ P entsprechende Menge der unteren Phase des Lipoidextraktes (in den meisten Fällen 0,5 ml) wird in den Reagenzgläsern eingedampft und in 0,5 ml 10n H_2SO_4 wieder aufgenommen. Anschliessend werden die organischen Bestandteile 4 Stunden lang bei 160°C im Ofen verascht, die entstandenen schwarzen Ascheteile durch Zugabe von 2 Tropfen Wasserstoffperoxyd (30%) und 2-stündiges Erhitzen auf 160 °C beseitigt. Nach dem Veraschen befindet sich im Glas ein

Rückstand von 0,2 ml. Dazu gibt man in strenger Reihenfolge 4,2 ml aqua dest. und 0,4 ml Ammoniummolybdatlösung. Erst wenn alle Gläser soweit aufgefüllt und umgeschüttelt sind, setzt man 0,2 ml Reduktionsmittel zu.

Dieses Gemisch mit einem Endvolumen von 4,8 ml wird nach gutem Schütteln für 7 Minuten in ein kochendes Wasserbad gebracht. Aufgelegte Glaskugeln verhindern eine Volumenabnahme. Nach dem Abkühlen wird bei 830 m μ aqua dest. abgelesen.

Leerwert und Eichwert (= 28P pro ml) werden im Triplikat verascht wie auch unverascht mit durch die Analyse geführt, und ersterer von allen Werten abgezogen, letzterer zur Bestimmung der Absolutmenge benutzt. Alle Proben wurden im Triplikat bestimmt. Mit dem Faktor 25 wird von Lipoidphosphor auf Phosphatid umgerechnet.

Sphingomyelinbestimmung:

Für diese Bestimmung wurde eine Modifikation der von J.S. Thannhauser und Mitarbeitern (12) angegebenen Methodik

benützt, bei der sich der Sphingomyelin-Phosphor aus der Differenz des Gesamtlipoid-Phosphor und der mit Alkali verseifbaren Phosphatidfraktion ergibt. Durch milde Alkalieinwirkung werden die Fettsäuren der Glyzerinphosphatide abgespalten, der P-haltige Rest wird dadurch wasserlöslich.

Reagentien: 1 n KOH
 1 %-ige Eiweissalbuminlösung
 1 n HCl
 10 %-ige Trichloraceticlösung
 10 n Schwefelsäure
 Wasserstoffperoxyd (30%)
 Ammoniummolybdat 2,5 %, wässrige Lösung
 Reduktionsmittel
 Aqua bidest.
 Standardlösung von 2 g/ml 0,002 n H_2SO_4
 peinlich gesäuberte Glaswaren

Im einzelnen wurde folgendermassen vorgegangen:

Von der Chloroformphase des Sperry-Extraktes wird 1 ccm im Reagenzglas zur Trockne gebracht und zum Rückstand 1 ccm 1 n Kalilauge zugegeben. Das mit einem Gummistopfen fest verschlossene Glas wird nach 5-minütigem kräftigem Schütteln für 24 Stunden bei 37 °C im Thermostaten aufbewahrt. Nach Ablauf dieser Zeit werden sofort 0,2 ccm 1 %-ige Ei-

weissalbuminlösung, 1 ccm 1 n Salzsäure und 1 ccm 10 %-ige Trichloressigsäure in dieser Reihenfolge zugegeben, und das Gemisch für 2 Stunden stehengelassen. Nun wird die Emulsion zentrifugiert und der in der Regel wasserklare Überstand dekantiert. Von diesem werden 2,5 ccm über der Bunsenflamme auf 0,5 ccm eingeeengt und nach Zugabe von 1 ccm 10 n H_2SO_4 der schon beschriebenen Veraschung zur anschliessenden P-Analyse unterworfen. Entsprechend dem 1 ccm 10 n H_2SO_4 werden in diesem Falle 8,4 ccm aqua dest, 0,8 ccm Ammoniummolybdat und 0,4 ccm Reduktionsmittel zugegeben. Auch diese Analyse wurde im Triplikat durchgeführt. Als Leerwert wurden Proben mit 1 ml Chloroform p.a. verwandt. Die vollständige Analyse einer Probe (Sperry-Extrakt, Cholesterin, Gesamtphosphor und Sphingomyelin) nahm nie mehr als 3 Tage in Anspruch.

Berechnung:

Ergibt sich für eine Monaminophosphatid der Wert 3,48 μ P

und wurden von dem 3,2 ccm des Gemisches 2,5 ccm in die
F-Analyse verbraucht, so ergibt sich folgende Berechnung:

$$\frac{3,48 \times 3,2 \times 14,0 \times 5 \times 100}{2,5 \times 4 \times 100} = 7,795 \text{ mg\%}$$

Monaminophosphatid-Phosphor

Analog Gesamtposphatid-Phosphor bei einem δ -Wert von
4,86 für 1 ccm untere Phase:

$$\bullet \quad \frac{4,86 \times 14,0 \times 5 \times 100}{4 \times 100} = 8,505 \text{ mg\%} \quad \text{Gesamtlipoid-Phosphor}$$

Differenz:

$$8,505 - 7,795 = 0,710 \text{ mg\%} \quad \text{Sphingomyelinphosphor}$$

Quotient:

$$\frac{7,795}{8,505} \times 100 = 91,6 \% \quad \text{Sphingomyelinphosphor}$$

III. Ergebnis

Bei den von uns untersuchten Fällen ist der Cholesterin-Phosphatid-Quotient, wie auch schon früher nachgewiesen (6, 8), zu wenig konstant, als dass man ihn diagnostisch verwerten könnte (s. auch Tabelle 1). Bei ansteigenden Cholesterinwerten zeigen die Gesamtphosphatide und Glycerinphosphatide ein paralleles Verhalten im Sinne einer Zunahme (Abb. 1), wogegen Sphingomyelin in der gleichen Situation eine relative Abnahme aufweist (Abb. 2). Daraus ergibt sich ein umgekehrt proportionales Verhalten von Glycerinphosphatiden und Sphingomyelin (Abb. 3). Entgegen dem Bericht von Kayden und Mitarbeitern (15) liess sich im Verhalten von Cholesterin und Sphingomyelin eine Parallelität nicht nachweisen.

IV. Diskussion

Schon Hevelke (14) spricht auch makroskopisch unveränderten Aorten mit zunehmendem Lebensalter eine steigende Einlagerung von Fettstoffen zu, wobei im Rahmen des Gesamtfettes sich die Anteile prozentual zu Ungunsten der Phosphatide verschieben.

Heyrovsky (15) konnte diese Befunde bestätigen, insbesondere konnte er für arteriosklerotische Aorten einen Cholesterin-Phosphatid-Quotienten, der bei seinen Untersuchungen normalerweise um 1,0 lag, von bis über 4,0 nachweisen. Er hält den ungleichmässigen Anstieg von Cholesterin und Phosphatiden in der Gefässwand für die Ablagerung bzw. für den Abtransport des abgelagerten Cholesterins von besonderer Wichtigkeit.

Heyrovsky (15) fand weiterhin im Plasma von jungen und älteren Normalpersonen sowie bei Arteriosklerotikern keine wesentlichen Unterschiede im Sphingomyelinanteil, seine Werte lagen zwischen 15 und 20 %. Bei der Untersuchung der

Aorten dieser Personengruppe stieg der Sphingomyelingehalt von 36 % der Gesamtposphatide bei den jungen Normalpersonen auf 50 und 60 % bei Arteriosklerotikern. Er kommt zu dem Schluss, dass der Schwund von stoffwechselfreudigeren Glycerophosphatiden und die Zunahme von metabolisch viel trägeren Sphingolipoiden für den Stoffwechsel der Arterienwand im allgemeinen gleichgültig sein kann.

Die Befunde, den Sphingomyelingehalt des Plasmas betreffend, können wir nicht bestätigen. Nach unseren Ergebnissen scheint die schon berichtete Zunahme (15, 13) des Sphingomyelins in der Aorta bei erhöhten Cholesterinwerten mit einer relativen Abnahme des Sphingomyelins im Plasma einherzugehen. Ob jedoch dieser Verschiebung im Phosphatidspektrum im Rahmen der den Phosphatiden allgemein zugesprochenen lösungsstabilisierenden Eigenschaft eine Bedeutung zukommt, oder ob sie schon Folge eines anderen die Anreicherung der Gefäßwand mit Fettstoffen verursachenden Faktums ist, lässt sich noch nicht beurteilen.

V. Zusammenfassung

Bei einer Gruppe von Patienten der Medizinischen Universitäts-Poliklinik München mit unterschiedlichen Serum-Cholesterinspiegeln wurde der Gesamtphosphatid-Phosphor und Sphingomyelin-Phosphor bestimmt. Cholesterin, Gesamtphosphatide und Glycerinphosphatide zeigen ein paralleles Verhalten, während Sphingomyelin mit steigendem Cholesterin relative Abnahme zeigt. Der Cholesterin-Phosphatid-Quotient erwies sich als sehr unbeständig.

VI. Literatur

1.) P. Karrer, Lehrbuch der Organischen Chemie 1959
Thieme-Verlag, Stuttgart
2.) H.J. Deul, jr. The Lipids 1955, Interscience
Publishers Inc. New York
3.) A.D. Marenzi und C.E. Cardini, J. Biol. Chemie
147, 371 - 378, 1943.
4.) S.J. Thannhauser, J. Benotti, und H. Reinstein,
J. Biol. Chemie, 129, 709 - 716, 1929.
5.) N. Zöllner und K. Kirsch, Zeitschrift f. ges.
exper. Med., 134, 10 - 28, 1960.
6.) N. Zöllner in Thannhausers Lehrbuch des Stoff-
wechsels und der Stoffwechselkrankheiten,
Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1957.
7.) J.P. Peters und E.B. Man, J. Clin. Invest., 22,
707 - 714, 1943.
8.) Nach F.A. Pezold, Lipide und Lipoproteide im
Blutplasma, 1961, Springer-Verlag,
Heidelberg.
9.) B. Zak, R.C. Dickenman, E.G. White, H. Burnett und
P.J. Cherny: Americ. J. Clin. Path.,
24, 1307, 1954.
- 10.) Sperry, W.M., Lipide Analysis. In: Methods of
Biochemical Analysis. Vol. 2, p. 83,
New York/London: Interscience Publishers
1955.
- 11.) G.R. Bartlett, J. Biol. Chem. 234, 466, 1959.
- 12.) G. Schmidt, J. Benotti, B. Herschman und S.J.
Thannhauser, J. Biol. Chem. 166, 505,
1946.
- 13.) H.J. Kayden, und J.M. Steele, Meeting Am. Soc.
Arterioscl. Chicago 1957, Ref. in Cir-
culation 16, 189, 1957.
- 14.) G. Hevelke, Dtsch. Arch. klin.Med. 203, 528, 1956.
- 15.) A. Heyrovsky, Gefäßwand und Blutplasma. Symp. der
Med. Akademie Magdeburg, 2. u. 3. 10.
1959, VEB Gustav Fischer-Verlag, Jena.

Tabelle 1

ame. Geschlecht Diagnose	Alter in Jahren	Cholesterin mg% im Serum	Gesamt- lipoid-P mg%	Glycerin- phosphatid-P mg% im Serum	% im Serum	Sphingomyelin F mg%	Cholesterin/ phosphatid- quotient
Jch. a. Osteomyelose	70	127	6,43	5,22	81,18	1,21	0,79
Dr. F. Verkalkung des Aortenbogens	40	134	6,411	5,593	87,2	0,818	0,84
L.T. Tachycardie	45	139	6,878	5,778	84	1,099	0,81
St.S. Hyperthyreose	49	167	7,84	6,94	88,5	0,897	0,85
J.W. gesund	62	175	8,312	7,625	91,73	0,687	0,84
S.H. gesund	25		8,723	9,067	103	0	
L.H. gesund	26		7,772	7,12	91,6	0,652	8,4
S.S. gesund	27		7,028	6,311	89,7	0,717	10,3
B.A. gesund	28		8,505	7,795	91,6	0,710	8,5
Sch.H. L.S-Syndrom	27	210	4,71	3,902	82,8	0,808	17,2
StG.	60	254	8,70	8,225	94,54	0,475	5,5
							1,17

Name, Geschlecht Diagnose	Alter in Jahren	Cholesterin mg% im Serum	Gesamt- lipoid-P mg%	Glycerin- phosphatid-P		Sphingomyelin-P		Cholesterin/ Phosphatid- Quotient
				mg% im Serum	% im Serum	mg%	%	
M. St. ♀ Hypertonie, Cofo- narinsuffizienz, Arteriosklerose, ulcus cruris	75	287	9,275	9,520	102,6	0	0	1,24
Re.M ♂ Obliterierende Angiopathie	62	344	9,030	8,466	93,7	0,564	6,3	1,52
Wi.A. ♂ Obliterierende Angiopathie	58	344	8,75	8,287	94,7	0,463	5,3	1,57
Rö. M. ♂ Idiopath. Hypercho- lesterinämie	54	407	28,74	27,94	97,5	0,79	2,5	0,57
Re. X. ♂ Idiopath. familiäre Hypercholesterinä- mische Xanthomatose	41	409	9,605	9,314	97,2	0,264	2,8	1,7
Sch. K. ♀ Hepatitis	59	420	35	34,68	99	0,32	0,9	0,42
Th. E. ♂ Lebercirrhose	32	800	24,4	23,44	96	0,96	4	1,31

Abb. 1

254 Glycerin-P
[mg %]

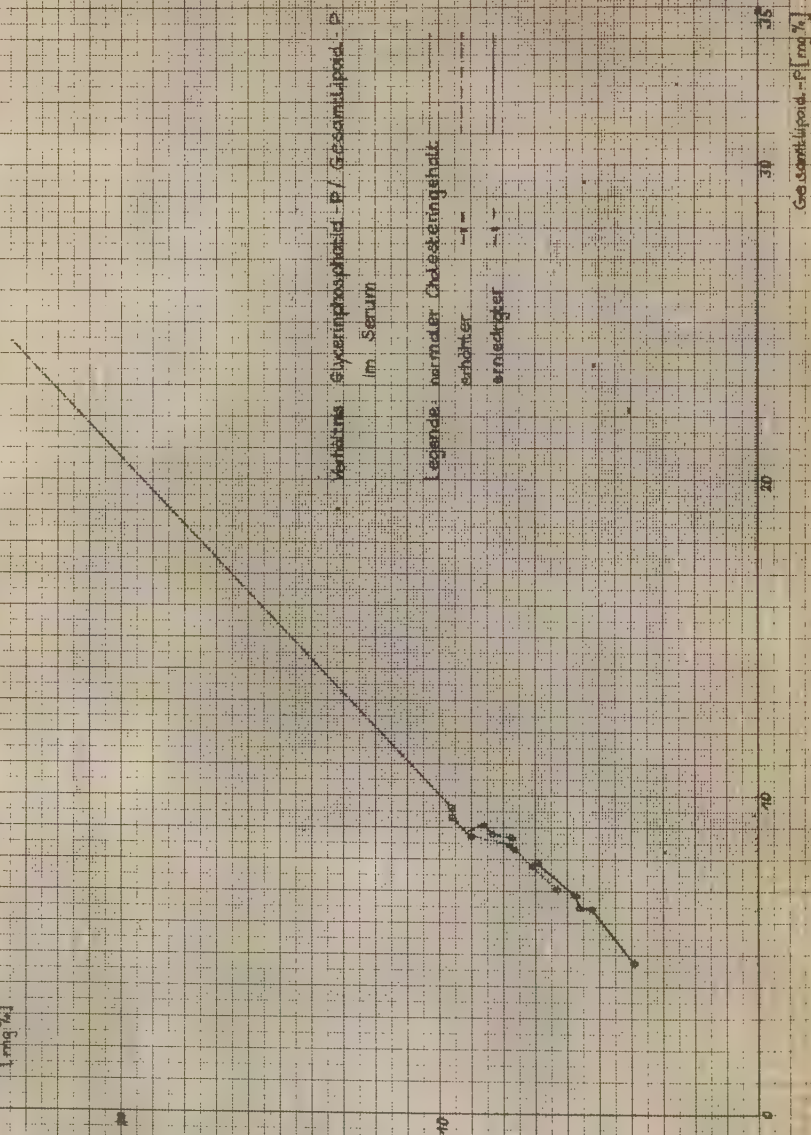


Abb. 2

Verhältnis: Gesamtlipid-P/Spingomyelin-P im Serum

Legende: normaler Cholesteringehalt

erhöhter

erniedrigter

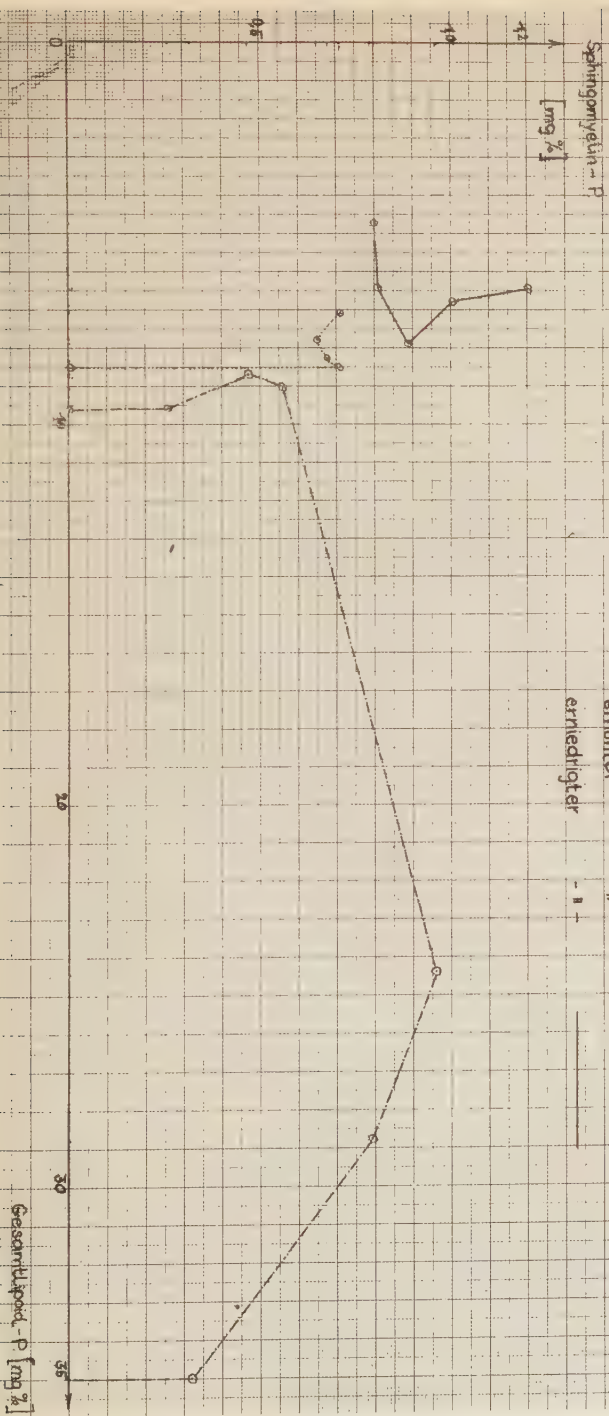


Abb. 3

Verhältnis Glycerinphosphatid - P / Sphingomyelin - P im Serum

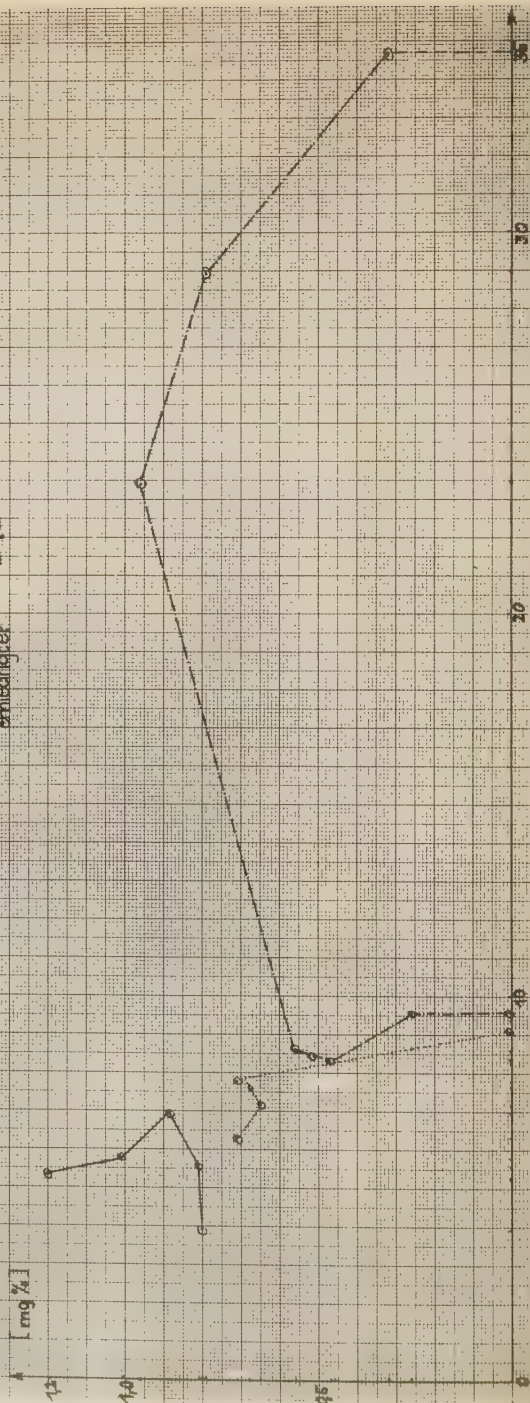
Legende: normaler Cholesteringehalt

erhöhter

erniedrigter

Sphingomyelin - P
[mg %]

Glycerinphosphatid - P [mg %]



VIII. Lebenslauf

Als Sohn des Kaufmanns Esfandiar und seiner Ehefrau Golbanu wurde ich am 27. Oktober 1934 in Yazd, Iran geboren. In Schiras begann ich meine Schulausbildung, und im Jahre 1955 legte ich meine Reifeprüfung am Sultani-Gymnasium in Schiras ab. Ich entschloss mich, in Deutschland Medizin zu studieren. Nach einer Prüfung meiner deutschen Sprachkenntnisse in Teheran fuhr ich im August 1956 nach Deutschland und begann im November 1956 in München mit dem Medizinstudium. Nach bestandener ärztlicher Vorprüfung im Jahre 1959 legte ich am 2. Juli 1964 das medizinische Staatsexamen an der Ludwig-Maximilian-Universität in München ab.

Herrn Professor Dr. N. Zöllner danke ich für die Überlassung des Themas, den Arbeitsplatz im Labor 390 der Medizinischen Poliklinik, für seinen Rat und Hilfe bei der Ausführung der Arbeit, sowie für Durchsicht und Beurteilung der Niederschrift.

Ebenso geht mein Dank an die technische Assistentin Frl. Kirch, die mir bei der Durchführung der Versuche behilflich war.

